



School of Pharmacy

Kerman University of Medical Sciences

For the certificate of Pharm. D Degree

Title :

Evaluation of tyrosinase enzyme inhibitory and copper chelating effect
of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* L., *Trigonella foenum*
graecum L., *Olea europea* L., *Achillea wilhelmsii*
C.Koch.and *Tanacetum parthenium* L

By :

Sahar eslamipannah

Supervisors :

Dr. Fariba Sharififar

Dr. Payam Khazaeli

Dr. Ali Asadipoor



Spring 2015

Thesis No :778

خلاصه فارسی

مقدمه: آنزیم تیروزیناز نقش کلیدی در بیوسنتز ملانین، رنگدانه مهم پوستی دارد. با توجه به اقبال عمومی در خصوص فرآورده های روشن کننده رنگ پوست، در این تحقیق اثر مهار کنندگی غلظت های مختلف ۵ گیاه دارویی شنبلیله، زیتون، بومادران، شیرین بیان و تاناستوم مورد بررسی قرار گرفته است. هم چنین اثر شلات کنندگی مس آنزیم تیروزیناز توسط عصاره های گیاهی نیز به عنوان یک مکانیسم مهار آنزیم تعیین شده است.

روش کار: عصاره گیاهان بعد از جمع آوری، تایید نام علمی، آسیاب و الک کردن اندام دارویی گیاهان با متانول ۸۰٪ تهیه گردید. بعد از انجام بیواتوگرافی، با استفاده از سوبسترای ال تیروزین و آنزیم تیروزیناز قارچی، حداکثر درصد مهار تیروزین و IC_{50} عصاره های گیاهی در مقایسه با هیدروکینون در زمانهای صفر تا ده دقیقه تعیین و اندازه گیری شد. طیف UV عصاره ها در حضور آنزیم و بدون حضور آنزیم تیروزیناز و با سولفات مس جهت تعیین اثر شلات کنندگی مس عصاره ها تهیه و مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج: همه عصاره های گیاهی با اثر وابسته به دوز و وابسته به زمان قادر به مهار آنزیم تیروزیناز بوده اند. بیشترین اثر مهاری مربوط به گیاه بومادران (حداکثر مهار ۹۳/۱٪ در غلظت ۴۰۰ میکروگرم / میلی لیتر و با IC_{50} کمتر از ۱۲/۵ میکروگرم/میلی لیتر) می باشد که قابل مقایسه با هیدروکینون به عنوان داروی استاندارد بوده است. عصاره های زیتون و شیرین بیان بعد از بومادران به ترتیب بیشترین مهار را نشان داده اند. در طیف UV عصاره ها، شیفیت باتوکرومیک در حضور سولفات مس و بازگشت شیفیت در حضور آنزیم تیروزیناز در سه گیاه بومادران، شنبلیله و زیتون نشان می دهد که این سه گیاه با مکانیسم شلات کنندگی مس نیز قادر به مهار تیروزیناز می باشند. بیشترین تغییرات شیفیت مربوط به گیاه زیتون می باشد.

نتیجه گیری: هر ۵ گیاه بیش از ۹۰٪ مهار تیروزیناز را نشان داده اند که با IC_{50} کمتر از ۱۲/۵ در مورد چهار گیاه و برابر با ۱۵/۲ برای شیرین بیان همراه بوده است. هر پنج گیاه وابسته به غلظت عمل کرده اند و لذا کاندید مناسبی برای جداسازی فراکسیونهای فعال گیاه می باشند. سه گیاه شیرین بیان، شنبلیله و زیتون نسبت به دو گیاه دیگر در دقایق اول انکوباسیون قدرت مهاری بیشتری را نشان داده اند.

کلیدواژه: مهار تیروزیناز- گیاه دارویی- شلات کنندگی مس

Abstract

Introduction: Tyrosinase enzyme plays a key role in the biosynthesis of melanin with regard to the public interest the skin products as whitening agent. Tyrosinase inhibitory effect of different concentration of 5 medicinal plants including: *Trigonella foenum*, *Olea europea*, *Achillea millefolium*, *Glycyrrhiza glabra* and *Tanacetum parthenium* is studied in this research. Also the effect of the tyrosinase enzyme by copper chelating plant extracts is determined as well as a mechanism of inhibition.

Methods: Plant extracts were prepared after collecting plants and confirming scientific name, grinding and passing through sieve with methanol 80 %. After bioautography, the maximum percentage of tyrosinase inhibition and herbal IC_{50} was compared to hydroquinone in zero to ten minutes was determined and measured by L-tyrosine and mushroom tyrosinase enzyme. UV spectrum of extracts were prepared and analyzed in presence and absence of $Cu SO_4$ and tyrosinase enzyme for determining of the effect of copper chelating of extracts.

Results: All herbal extracts with a concentration-dependent and time-dependent effect have been able to inhibit the tyrosinase. Maximum inhibitory effect is related to Yarrow (maximum inhibition of 93.1% at concentration of 400 $\mu g/ml$ and IC_{50} less than 12.5 $\mu g/ml$). Olive and Licoric extracts demonstrated the highest tyrosinase inhibition after Yarrow. In UV spectrum of extracts, the bathochromic shift is related to copper chelating effect in absorption spectrum, was observed that Yarrow, fenugreek and olive exhibited the greatest shift which is due to their Cu chelatory effect of these plants. The highest shift was due to olive.

Conclusion : According to the obtained results, all of five tested plants exhibited more than 90% tyrosinase inhibition with IC_{50} less than 12.5 $\mu g/ml$ for four plant and equal to 15.2 for licorice. All tested plants inhibited tyrosinase in a concentration related manner and would be a good candidate for further studies. Fenugreek, licorice and olive exhibited more inhibitory effect in primary minutes of incubation in relation to the other two plants.

Key words: Tyrosinase inhibition, medicinal plant, Cu chelatory